

資料 9. 進行・再発療法(M)症例の患者背景
(平成 18 年 3 月の時点)

患者背景	症例数	%
全患者数 (化学療法施行数)	30	100
年齢	59 (28-74)	
閉経		
前	14	47
後	16	53
ECOG PS		
0	10	33
1	19	63
2	1	3
組織型		
浸潤性乳管癌-乳頭状	9	30
浸潤性乳管癌-硬癌	7	23
その他	14	47
組織学的悪性度		
2	11	37
3	19	63
エストロゲン受容体		
陽性	12	40
陰性	18	60
プロゲステロン受容体		
陽性	11	37
陰性	19	63
HER2/neu 遺伝子状況		
陽性	30	100
陰性	0	0
奏効		
CR	1	3
PR	2	7
Long SD	6	20
Short SD	7	23
PD	10	33
NE	4	14

資料 10. 3人の健常人ボランティアより採取した末梢血単核球 (PBMC) を用いた ADCC の個人差の検討—MTT アッセイ

乳癌細胞 HER2 が過剰発現している乳癌細胞株 MCF-7 および BT474 を用いて、E/T 比 (エフェクター細胞 / 腫瘍細胞比) 10 の PBMC 存在下に 0-5ug/ml のハーセプチンを投与し、72 時間後の MTT アッセイを行った。3 被験者間で ADCC に差が認められ、さらにその個人差は日を変えて同被験者で行った再実験においても再現された。(図 1. a) b))

細胞株 MCF-7 および BT474

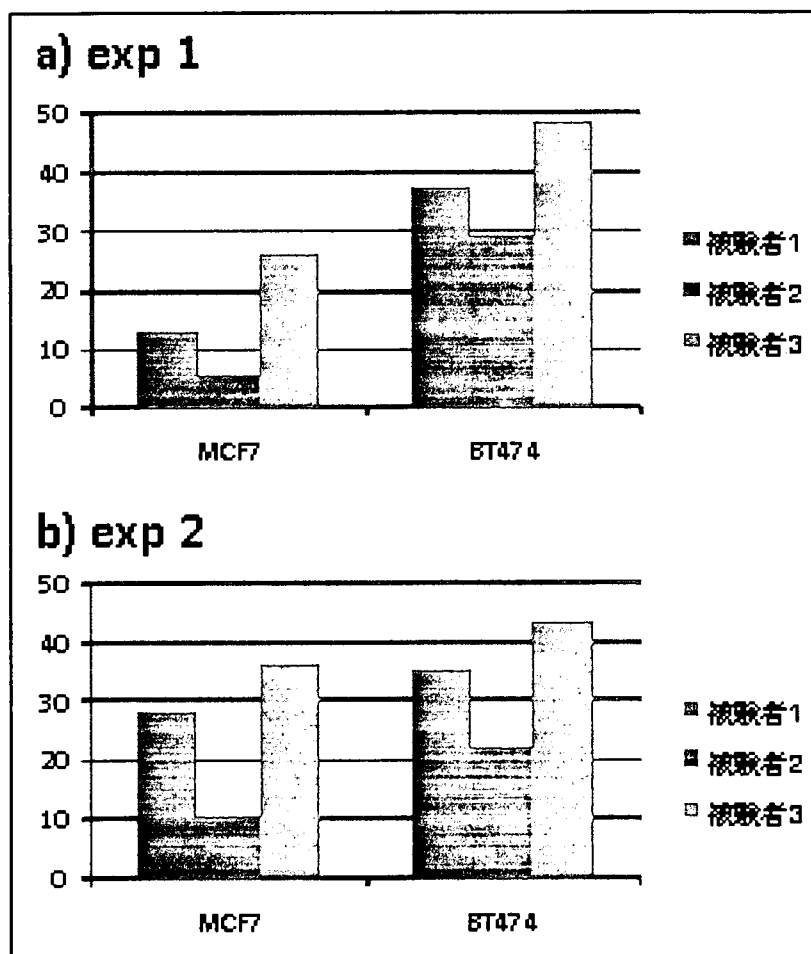


図 1

資料 11. 3人の健常人ボランティアより採取した末梢血単核球 (PBMC) を用いた ADCC の個人差の検討—Calcein assay

MCF-7 を用いて Calcein-AM (BD bioscience) にて染色し、E/T 比 10 の PBMC 存在下に 5ug/ml のハーセプチンを投与した。4時間培養後に上清中の Calcein 遊離を蛍光測定した。MTT 法と同様の個人差が認められた。(図 2)

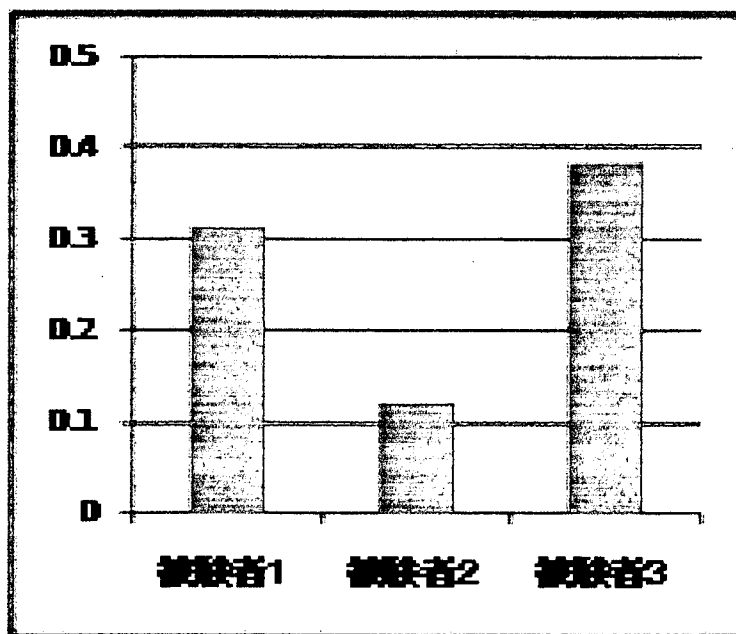
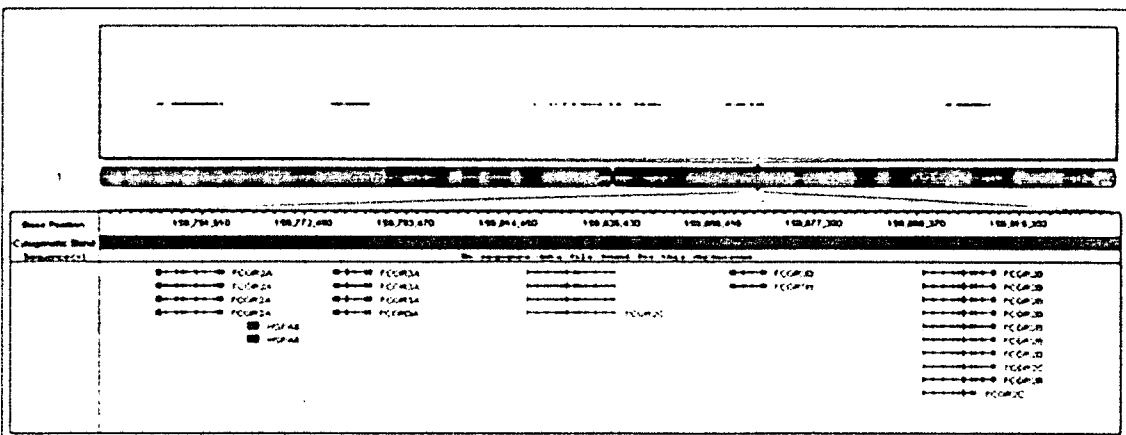
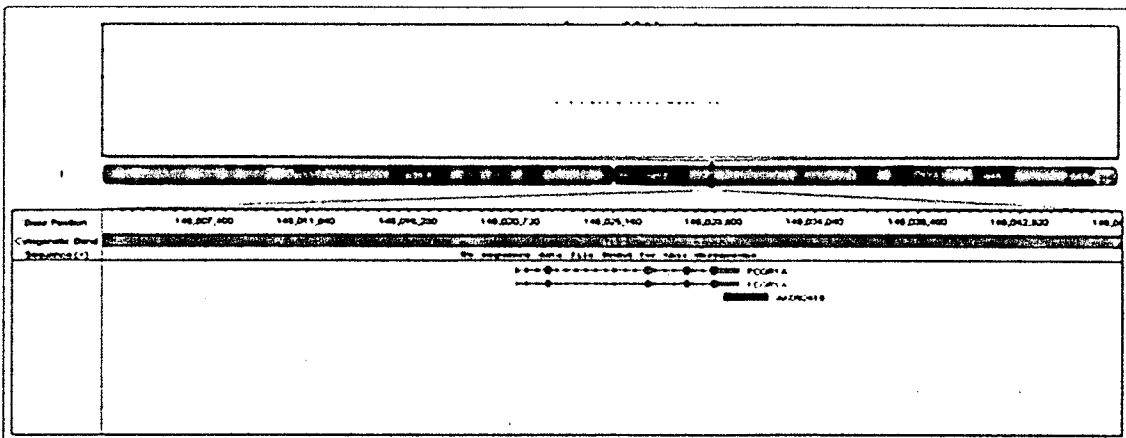
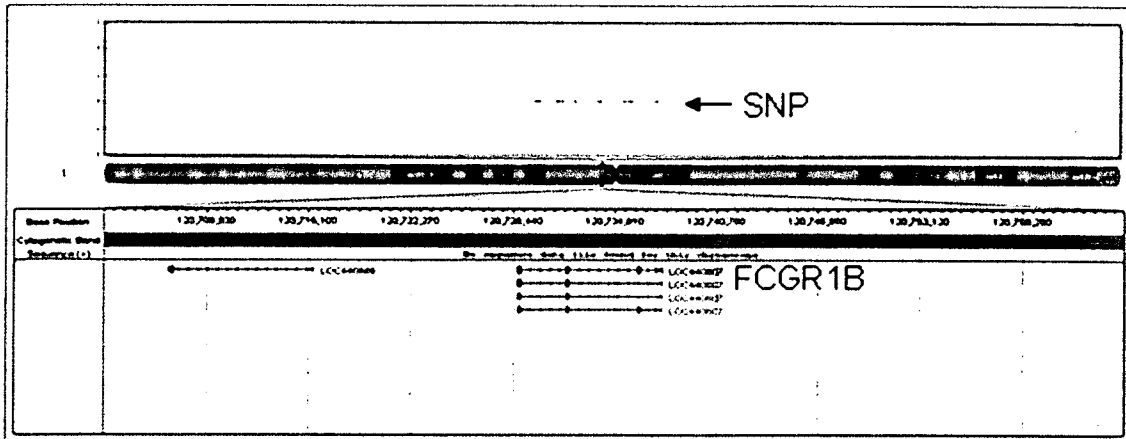


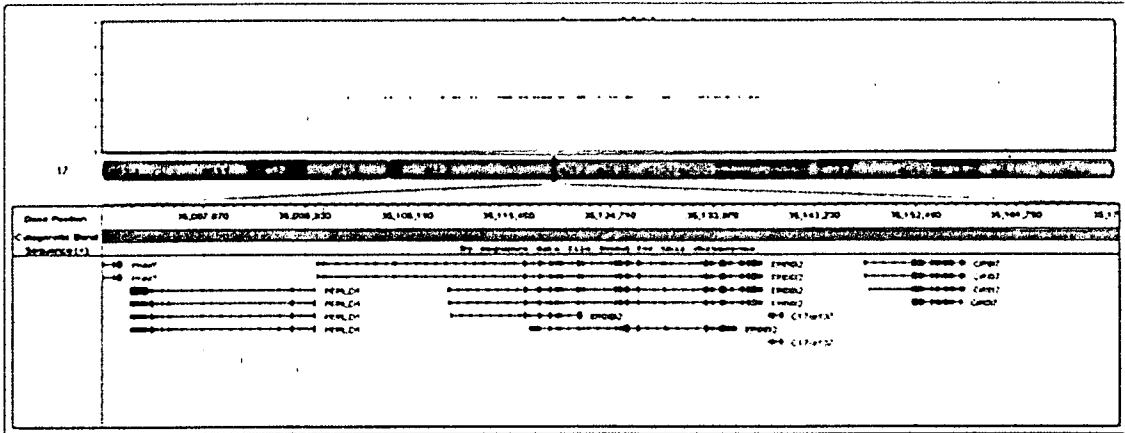
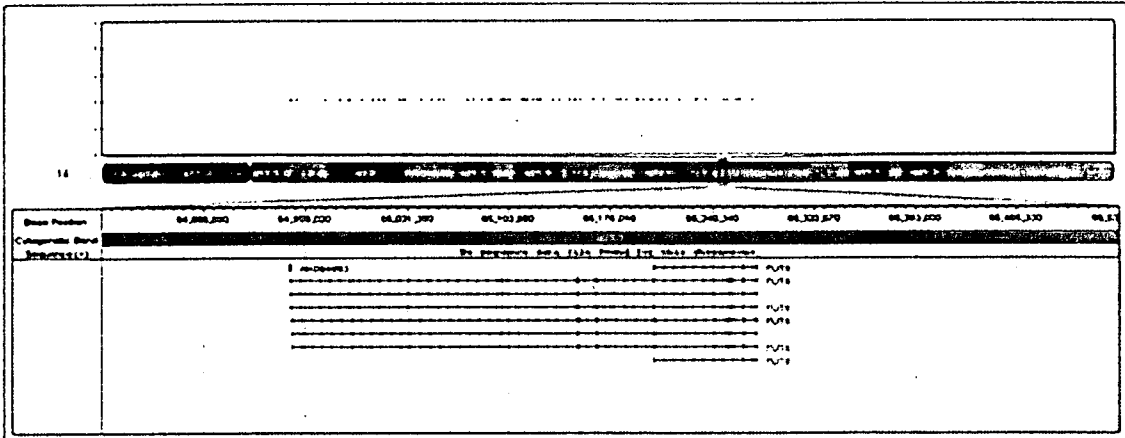
図 2

資料 12. 解析した遺伝子多型の遺伝子名、染色体番号、SNPS 数
 384 locus での SNPS 解析を施行した。

遺伝子名	染色体番号	搭載 SNP 数 (個)	Exon 領域内 SNP 数 (個)
FCgR1A	1	21	4
FCgR1B	1	14	1
FCgR2A	1	61	12
FCgR2B	1	35	3
FCgR2C	1	40	2
FCgR3A	1	46	16
FCgR3B	1	19	6
FUT8	14	79	6
ERBB2	17	69	17
Total		384	67

資料 13. 各遺伝子多型の染色体上の locus





資料 14. 各遺伝多型の検出率

検体番号	MSI ID	#No.Calls	#Calls	#SNPs *	Call Freq
BW-N-002-01	N002	0	381	381	1
BW-N-003-01	N003	1	380	381	0.9974
BW-N-006-01	N006	1	380	381	0.9974
BW-N-007-01	N007	0	381	381	1
BW-N-008-01	N008	0	381	381	1
BW-N-009-01	N009	1	380	381	0.9974
BW-N-010-01	N010	0	381	381	1
BW-N-011-01	N011	1	380	381	0.9974
BW-N-018-01	N018	0	381	381	1
BW-N-019-01	N019	0	381	381	1
BW-N-021-01	N021	0	381	381	1
BW-N-022-01	N022	3	378	381	0.9921
BW-N-025-01	N025	2	379	381	0.9948
BW-N-027-01	N027	0	381	381	1
BW-N-030-01	N030	1	380	381	0.9974
BW-N-033-01	N033	2	379	381	0.9948
BW-N-034-01	N034	1	380	381	0.9974
BW-N-035-01	N035	1	380	381	0.9974
BW-N-036-01	N036	2	379	381	0.9948
BW-N-037-01	N037	0	381	381	1
BW-N-038-01	N038	1	380	381	0.9974
BW-N-039-01	N039	1	380	381	0.9974
BW-M-001-01	M001	0	381	381	1
BW-M-002-01	M002	1	380	381	0.9974
BW-M-003-01	M003	0	381	381	1
BW-M-004-01	M004	0	381	381	1
BW-M-005-01	M005	0	381	381	1
BW-M-007-01	M007	0	381	381	1
BW-M-008-01	M008	0	381	381	1
BW-M-009-01	M009	0	381	381	1
BW-M-010-01	M010	0	381	381	1

BW-M-011-01	M011	3	378	381	0.9921
BW-M-012-01	M012	2	379	381	0.9948
BW-M-013-01	M013	0	381	381	1
BW-M-014-01	M014	0	381	381	1
BW-M-015-01	M015	0	381	381	1
BW-M-016-01	M016	0	381	381	1
BW-M-017-01	M017	1	380	381	0.9974
BW-M-018-01	M018	0	381	381	1
BW-M-019-01	M019	0	381	381	1
BW-M-020-01	M020	1	380	381	0.9974
BW-M-022-01	M022	0	381	381	1
NA18550	CHB **	2	379	381	0.9948
NA18558	CHB **	3	378	381	0.9921
NA18576	CHB **	1	380	381	0.9974
NA18944	JPT **	0	381	381	1
NA18949	JPT **	1	380	381	0.9974
NA18951	JPT **	0	381	381	1
NA18952	JPT **	1	380	381	0.9974
NA18960	JPT **	0	381	381	1
NA18968	JPT **	0	381	381	1
NA18978	JPT **	2	379	381	0.9948
NA18994	JPT **	2	379	381	0.9948
NA19003	JPT **	1	380	381	0.9974

**Coriell から購入した HapMap DNA (CHB+JPT)

資料 15. 各遺伝子多型の比率

遺伝子	Location	SNP		Major/Minor 比率 (サンプル数)			
		塩基配列	アミノ配列	Major	hetero	Minor	Total
		Major/Minor	Major/position/Minor	homo		homo	
FCGR1B	exon2	G/A	Arg/82/His	40	12	2	54
FCGR1A	exon4	T/A	Ser/181/Ser	54	0	0	54
FCGR1A	exon5	G/A	Arg/271/His	0	54	0	54
FCGR1A	exon6	A/G	Lys/314/Lys	54	0	0	54
FCGR1A	exon6	A/G	3'UTR	54	0	0	54
FCGR2A	exon3	A/G	Gln/61/Arg	54	0	0	54
FCGR2A	exon4	A/G	His/165/Arg	32	21	1	54
FCGR2A	exon5	A/G	Ile/216/Val	54	0	0	54
FCGR2A	exon7	T/C	Leu/272/Pro	0	3	51	54
FCGR2A	exon7	C/T	Asn/308/Asn	50	4	0	54
FCGR2A	exon7	T/C	3'UTR	36	17	1	54
FCGR2A	exon7	A/T	3'UTR	54	0	0	54
FCGR2A	exon7	A/G	3'UTR	23	28	3	54
FCGR2A	exon7	G/A	3'UTR	32	22	0	54
FCGR2A	exon7	A/G	3'UTR	0	0	54	54
FCGR2A	exon7	G/A	3'UTR	0	54	0	54
FCGR2A	exon7	G/A	3'UTR	0	54	0	54
FCGR3A	exon5	G/A	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3A	exon5	A/G	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3A	exon5	A/G	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3A	exon5	T/C	3'UTR	52	2	0	54
FCGR3A	exon5	A/C	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3A	exon5	C/T	3'UTR	0	54	0	54
FCGR3A	exon5	A/G	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3A	exon5	G/A	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3A	exon5	G/A	3'UTR	52	2	0	54
FCGR3A	exon5	C/T	Arg/269/Ter[*]	0	54	0	54
FCGR3A	exon5	T/C	Phe/238/Ser	0	4	50	54

FCGR3A	exon4	T/G	Phe/211/Val	3	27	24	54
FCGR3A	exon4	G/A	Gly/182/Asp	54	0	0	54
FCGR3A	exon3	T/G	Leu/101/Arg	54	0	0	54
FCGR3A	exon3	G/C	Arg/71/Ser	0	0	54	54
FCGR3A	exon1	A/T	Pro/30/Pro	0	0	54	54
FCGR2C	exon4	G/A	Thr/202/Thr	14	40	0	54
FCGR2C	exon7	C/G	Thr/270/Ser	18	25	11	54
FCGR3B	exon5	T/C	3'UTR	54	0	0	54
FCGR3B	exon5	C/G	3'UTR	0	0	54	54
FCGR3B	exon5	G/T	3'UTR	0	54	0	54
FCGR3B	exon5	T/C	3'UTR	16	26	6	48
FCGR3B	exon3	C/A	Ala/77/Asp	52	0	0	52
FCGR3B	exon3	T/C	Leu/37/Leu	7	30	17	54
FCGR2B	exon3	C/T	Gln/55/Ter[*]	0	4	50	54
FCGR2B	exon7	A/G	3'UTR	9	27	18	54
FCGR2B	exon7	G/C	3'UTR	54	0	0	54
FUT8	exon1	C/G	5'UTR	54	0	0	54
FUT8	exon1	G/C	5'UTR	54	0	0	54
FUT8	exon3	A/C	Lys/100/Gln	54	0	0	54
FUT8	exon6	G/A	Leu/189/Leu	54	0	0	54
FUT8	exon7	C/A	Thr/266/Lys	40	14	0	54
FUT8	exon11	G/C	3'UTR	9	24	21	54
ERBB2	exon4	G/A	5'UTR	54	0	0	54
ERBB2	exon5	G/A	Leu/2/Leu	54	0	0	54
ERBB2	exon6	C/G	Thr/96/Thr	54	0	0	54
ERBB2	exon14	C/T	Ser/392/Ser	51	0	3	54
ERBB2	exon15	G/T	Trp/421/Cys	54	0	0	54
ERBB2	exon17	G/A	Pro/531/Pro	54	0	0	54
ERBB2	exon20	A/G	Ile/624/Val	42	11	1	54
ERBB2	exon21	G/T	Ser/672/Ile	54	0	0	54
ERBB2	exon23	G/A	Gly/745/Ser	0	0	0	0
ERBB2	exon24	A/G	Asn/826/Ser	54	0	0	54
ERBB2	exon26	G/A	Glu/883/Lys	54	0	0	54
ERBB2	exon28	C/T	Pro/995/Pro	54	0	0	54
ERBB2	exon30	G/A	Lys/1146/Lys	54	0	0	54

ERBB2	exon30	G/A	Val/1222/Met	53	0	1	54
ERBB2	exon30	C/T	3'UTR	54	0	0	54
ERBB2	exon30	C/G	3'UTR	54	0	0	54
ERBB2	exon30	T/C	3'UTR	54	0	0	54

資料 16. 遺伝子多型解析に用いた、末梢血検体から抽出した DNA 濃度

検体番号	MSI ID	DNA 濃度 (ng/μL)
BW-N-002-01	N002	69.2
BW-N-003-01	N003	59.0
BW-N-006-01	N006	17.2
BW-N-007-01	N007	977.6
BW-N-008-01	N008	134.3
BW-N-009-01	N009	91.0
BW-N-010-01	N010	615.3
BW-N-011-01	N011	30.4
BW-N-018-01	N018	98.7
BW-N-019-01	N019	94.8
BW-N-021-01	N021	185.7
BW-N-022-01	N022	802.6
BW-N-025-01	N025	363.3
BW-N-027-01	N027	107.8
BW-N-030-01	N030	69.9
BW-N-033-01	N033	172.1
BW-N-034-01	N034	951.4
BW-N-035-01	N035	1107.4
BW-N-036-01	N036	247.2
BW-N-037-01	N037	1735.4
BW-N-038-01	N038	188.5
BW-N-039-01	N039	67.7
BW-M-001-01	M001	280.4
BW-M-002-01	M002	119.0
BW-M-003-01	M003	152.5

BW-M-004-01	M004	352.4
BW-M-005-01	M005	38.6
BW-M-007-01	M007	88.9
BW-M-008-01	M008	77.4
BW-M-009-01	M009	64.4
BW-M-010-01	M010	159.7
BW-M-011-01	M011	70.4
BW-M-012-01	M012	614.3
BW-M-013-01	M013	161.7
BW-M-014-01	M014	117.8
BW-M-015-01	M015	74.9
BW-M-016-01	M016	517.7
BW-M-017-01	M017	704.8
BW-M-018-01	M018	115.4
BW-M-019-01	M019	344.6
BW-M-020-01	M020	616.1
BW-M-022-01	M022	706.6

コントロール DNA

ID	Sample Description
NA18550	国際 HAPMAP プロジェクト, 漢民族中国人
NA18558	国際 HAPMAP プロジェクト, 漢民族中国人
NA18576	国際 HAPMAP プロジェクト, 漢民族中国人
NA18944	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18949	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18951	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18952	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18960	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18968	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18978	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA18994	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人
NA19003	国際 HAPMAP プロジェクト, 日本人

資料17. 術前化学療法(N)症例におけるHER2、抗体受容体(FcγR)、フコシルトランスフェラーゼの多型と病理学的寛解(pCR)との関係
—トラスツズマブ投与症例のみの解析—

Gene	Exon	アミノ配列	主多型	pCR 症例 の割合	non-pCR 症例 の割合	P
FCGR2A	4	HH/HA/AA	HH	25%	29%	NS
FCGR3A	4	FF/FV/VV	VV	75%	29%	NS
FCGR3B	5	TT/TC/CC*	TT	0%	60%	0.057
FCGR2B	7	AA/AG/GG*	AA	0%	22%	NS
FUT8	8	AA/AG/GG*	AA	0%	22%	NS
ERBB2	20	II/IV/VV	II	50%	86%	NS

*3' UTR

FCGR3A (FcγRIIIa-158 valine(V)/phenylalanine (F))多型と pCR

	V/V	V/F	FF	P
Pt. No.	5	6	0	NS
pCR	3 (60%)	1 (17%)	0	
Non-pCR	2	5	0	

FcγRIIIa-158 valine(V)/phenylalanine (F)の多型の出現比率は(F/F:F/V:V/V)が 6:50:44であった。N 症例（トラスツズマブ投与症例）で pCR が得られた症例における V/V 型が 75%であるのに対し、pCR が得られなかった症例の V/V 型は 29%であった。逆に、V/V 型の 60%に pCR が得られるのに対して、V/F型の 17%にしか pCR は得られない。

資料 18. 進行・再発乳癌療法(M)症例における HER2、抗体受容体(FcγR)、フコシルトランスフェラーゼの多型と有効割合(CR, PR and Long SD)との関係

Gene	Exon	アミノ配列	主多型	有効割合	非有効割合	P
FCGR1B	2	AA/AH/HH	AA	50%	30%	0.059
FCGR2A	4	HH/HA/AA	HH	50%	80%	NS
FCGR2A	7	AA/AG/GG*	AA	50%	90%	NS
FCGR3A	4	FF/FV/VV	VV	75%	30%	0.057
FCGR3B	5	TT/TC/CC*	TT	25%	12%	NS
FCGR2B	7	AA/AG/GG*	AA	12%	30%	NS
ERBB2	20	II/IV/VV	II	100%	80%	NS

*3' UTR

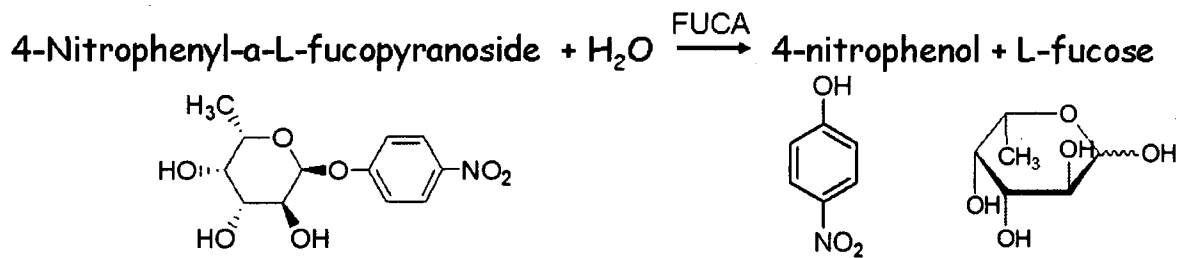
FCGR3A (FcγRIIIa-158 valine(V)/phenylalanine (F))多型と有効割合

	V/V	V/F	FF	P
Pt. No.	9	9	0	0.057
有効割合	6 (67%)	2 (22%)	0	
非有効割合	3	7	0	

M 症例有効割合の V/V 型が 75%であるのに対し、非有効割合の V/V 型は 30%であった (P=0.057)。逆に、V/V 型の 67%に有効(CR, PR and Long SD)が得られるのに対して、V/F 型の 22%にしか有効(CR, PR and Long SD)は得られない。

資料 19. α -L フコシダーゼ (FUCA) 活性測定法

— 化学反応式、及び、アッセイ系の概略 —



反応条件: 温度 37°C

反応時間: 180分 96 well micro-plate

試薬 / 酵素	添加量	終濃度
5 mM 4-Nitrophenyl- α -L-fucopyranoside	60 μ L	2 mM
Plasma / H ₂ O	20 μ L / 62.5 μ L	-
1 M Citrate Buffer, pH4.5	7.5 μ L	50 mM
Total	150 μ L	

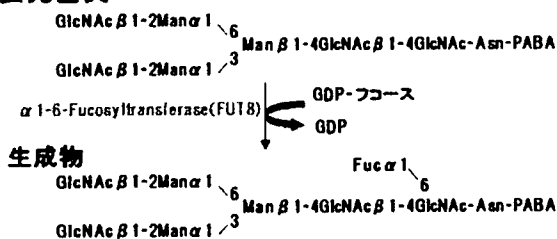
→ 酵素反応停止
0.4 M Borate Buffer, pH9.8, 100 μ L

↓

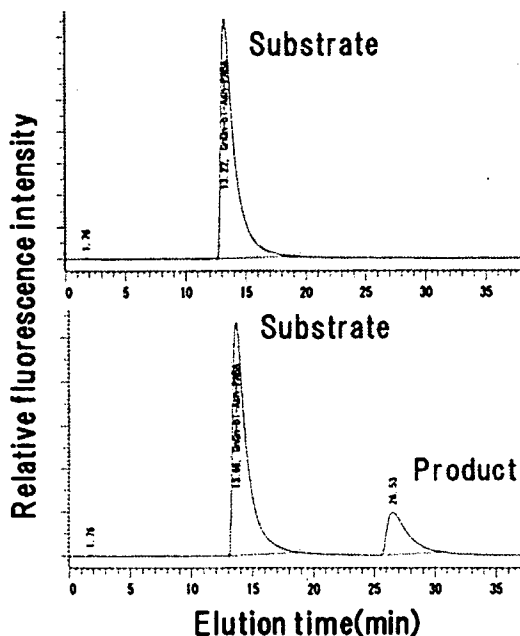
OD 405 nm測定
(Molecular Devices, VERSA max PLUS, microplate reader)

資料 20. α 1-6 フコシルトランフェラーゼ (FUT8) 活性測定法
—化学反応式、及び、アッセイ系の概略—

蛍光基質



Unit/L : 1時間に1Lあたり基質にFucoseを付加するFUT活性値
(活性値が4.86 nmol/h/Lのstandardサンプルと比較することによって、検体のFUT8活性値を換算する。)



Reaction mixture

試薬	添加量	終濃度
400mM MES-NaOH buffer(pH 7.0) 2% TritonX-100	25 μ L	200mM 1%
Substrate(2.5mM GnGn-Asn-PABA)	1 μ L	50 μ M
25mM GDP- β -Fucose	1 μ L	500 μ M
Plasma	23 μ L	—
Total	50 μ L	

37.0°C, incubate, 6h

↓
反応停止 : 100°C, 1min

↓
遠心 15,000 \times g, 10min

↓
上清 5 μ L
HPLC

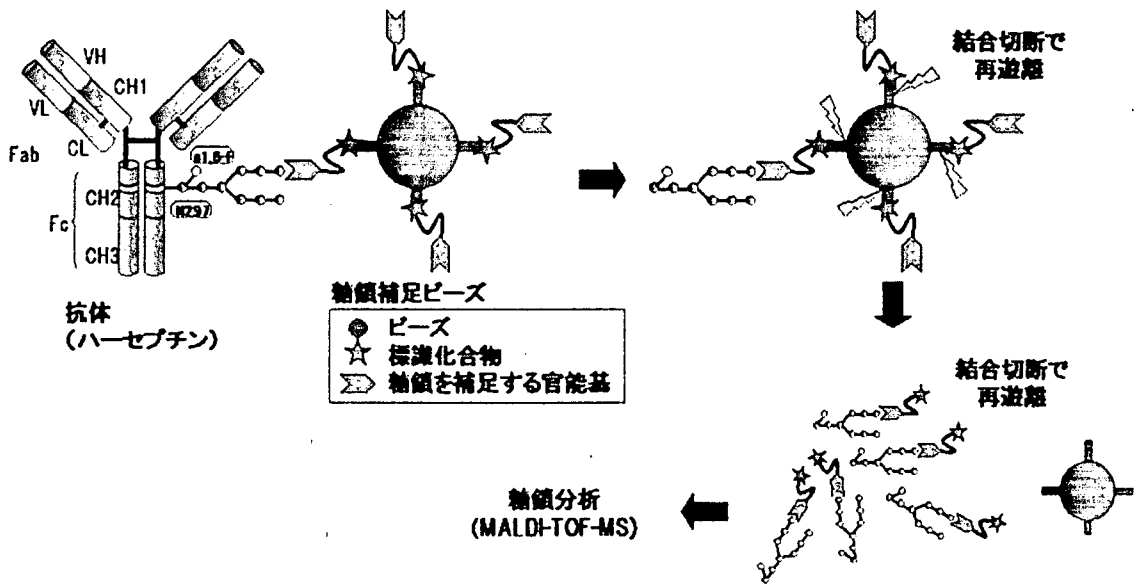
HPLC条件

Waters Model 510 Pump
 U6K injector
 HITACHI Fluorescence Spectrophotometer
 650-10LC
 HITACHI Integration Manager D-7000
 TSK-gel ODS-80TM column(4.6mm \times 150mm)
 Elution buffer : 20mM acetate buffer(pH4.0)
 0.1% butanol
 温度 : 55°C
 波長 : 320nm, 400nm

資料 21. MALDI-TOF-MS によるトラスツズマブの糖鎖解析

—反応図—

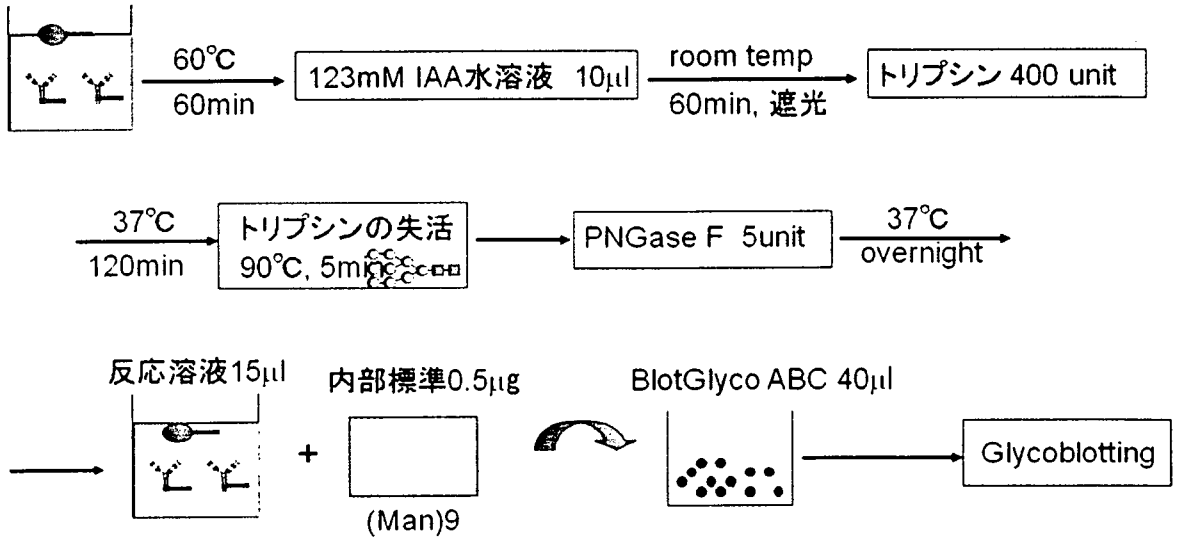
糖鎖補足ビーズ (BlotGlycoABC) を用いたトラスツズマブの糖鎖解析



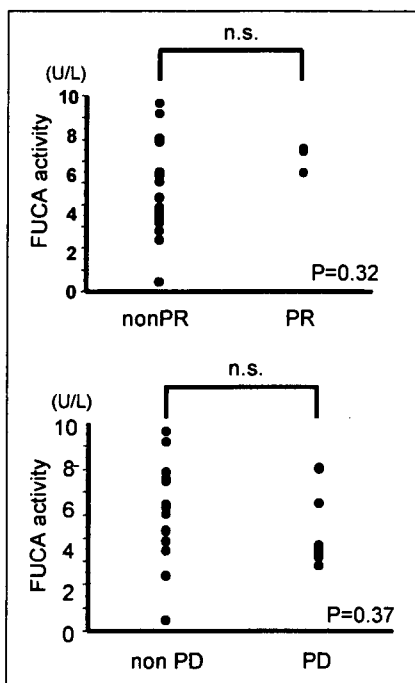
資料 22. MALDI-TOF-MS によるトラスツズマブの糖鎖解析
—アッセイ系—

方法

Plasma+トラスツズマブ反応液	30 μ l
1M 重炭酸アンモニウム	5 μ l
120mM DTT水溶液	5 μ l
H ₂ O	20 μ l

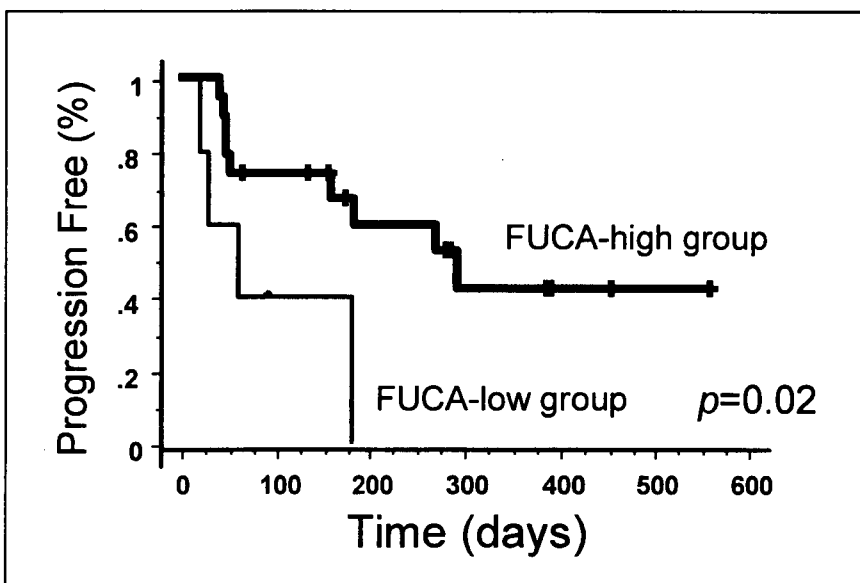


資料 23. FUCA 活性と治療効果



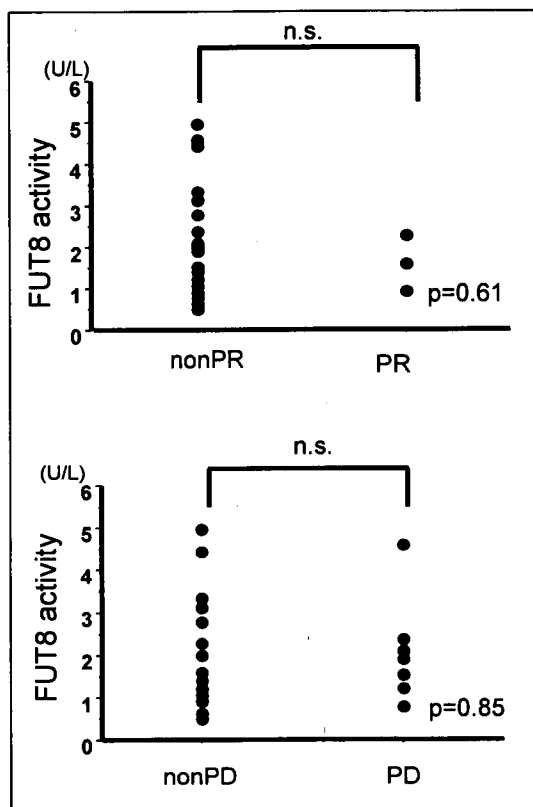
血漿中の α -L フコシダーゼ (FUCA) 活性をトラスツズマブ単独療法群 24 症例で測定した。測定値は生成物である 4-nitrophenol の標準曲線を用いることにより Unit/L に換算した。血漿中の FUCA 活性値は、1.5~9.7 Unit/L であった。

酵素活性値と臨床情報との相関を ところ、血漿中の FUCA 酵素活性値と治療効果との相関は認められなかった。



FUCA 酵素活性値を 4.3 Unit/L の閾値で群別化すると、FUCA 活性値が高い群 (FUCA high group) は低い群 (FUCA low group) と比較し、無増悪期間の有意な延長が認められた ($p=0.02$)。この結果は、血漿中の FUCA 活性値が高いとトラスツズマブの治療予後が良いことを示している。

資料 24. FUT8 活性と臨床効果



血漿中の α 1-6フコシルトランスフェラーゼ (FUT8)をトラスツズマブ単独療法群 24 症例で測定した。酵素活性値は標準サンプル (FUT8 発現細胞)の活性値と比較することにより Unit/L に換算した。血漿中の FUT8 活性値は 0.5~5.0 Unit/L であった。

酵素活性値と臨床情報との相関を検討したが、血漿中の FUT8 酵素活性値と臨床効果及び無増悪期間との相関は認められなかった。